

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C07K		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32891 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. September 1997 (12.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00458		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 7. März 1997 (07.03.97)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 196 08 813.5 7. März 1996 (07.03.96) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Rischerstrasse 12, D-69123 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROSE-JOHN, Stefan [DE/DE]; I. Medizinische Klinik - Abt. Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verfügbungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Obere Zahlbacherstrasse 63, D-55101 Mainz (DE).			
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderingerstrasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) Title: CONJUGATE FOR MODIFYING INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS**(54) Bezeichnung:** KONJUGAT ZUR BEEINFLUSSUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PROTEINEN**(57) Abstract**

The present invention concerns a conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity and connected via a linker. It also concerns the use of such a conjugate to modify interactions between proteins.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfasst, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

"Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen"

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, daß sich zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen eignet, eine ein solches Konjugat kodierende DNA und die Verwendung des Konjugats.

Viele Vorgänge in einem Organismus beruhen auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Beispiele solcher Wechselwirkungen finden sich bei Rezeptoren und den an sie bindenden Liganden. Oftmals sind allerdings die Wechselwirkungen zwischen Proteinen gestört. Dies kann daran liegen, daß einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine modifiziert sind, wodurch ihre Affinität zu anderen, ebenfalls beteiligten Proteinen verändert ist. Auch können einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine fehlen. Dies findet man z.B. bei Zellen, die nicht auf Interleukin-6 (IL-6) reagieren. Solche Zellen weisen einen unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor auf, d. h. dieser Rezeptor umfaßt lediglich die intrazelluläre, Signal-auslösende Untereinheit gp130, nicht aber die extrazelluläre, IL-6 bindende Untereinheit (IL-6R).

Viele Versuche werden unternommen, gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beheben. Beispielsweise wird dies bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor durch Verabreichung von IL-6 (50 ng/ml) und löslichem IL-6R (sIL-6R) (1280 ng/ml) versucht. Die Bereitstellung von sIL-6R bedingt jedoch einen großen Kosten- und Zeitaufwand, da sIL-6R nur biologisch aktiv ist, wenn es aus eukaryotischen Zellen stammt, und die Erträge aus solchen im Bereich von 1-6 mg sIL-6R/l liegen. Die genannte Verabreichung stellt somit kein geeignetes Mittel dar, dauerhaft die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor zu beheben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen, insbesondere bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor, behoben werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide" betrifft Polypeptide jeglicher Art, Herkunft und Länge, die eine Affinität zueinander aufweisen. Zwei solcher Polypeptide liegen in einem erfindungsgemäßen Konjugat vor. Eines dieser Polypeptide kann ein Rezeptor und das andere ein an den Rezeptor bindender Ligand sein. Der Rezeptor kann in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Liganden binden. Ebenso kann der Ligand in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Rezeptor binden. Vorzugsweise ist der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor, insbesondere ein Rezeptor für Lymphokine, Monokine, Interferone, "colony stimulating factors" oder Interleukine. Besonders bevorzugt ist der Rezeptor ein Interleukin-6-Rezeptor oder ein CNTF-Rezeptor. Entsprechendes gilt für den Liganden. Dieser ist vorzugsweise ein Zytokin, insbesondere ein Lymphokin, Monokin, Interferon, "colony stimulating factor" oder Interleukin. Besonders bevorzugt ist der Ligand ein Mitglied der Interleukin-6-Familie, insbesondere IL-6, IL-11, CNTF, OSM, LIF oder CT-1. Der Rezeptor und der Ligand können Wildtyp-Sequenzen oder hiervon durch ein oder mehrere Nukleotide unterschiedliche Sequenzen umfassen. Dadurch können der Rezeptor und der Ligand verbesserte und/oder neue Eigenschaften aufweisen. Verbesserte Eigenschaften können z.B. darin liegen, daß die Bindung zwischen dem Rezeptor und dem Ligand verbessert ist. Neue Eigenschaften können z.B. darin liegen, daß der Ligand ein verändertes Verhalten zu Proteinen zeigt, mit denen er nach Bindung an den Rezeptor reagiert. Beispielsweise kann IL-6 dahingehend verändert sein, daß es eine stärkere Bindung an den IL-6-Rezeptor hat, das Protein gp130 aber nicht mehr aktivieren kann. In einem solchen Fall umfaßt IL-6 vorzugsweise die Sequenz von Fig. 3 oder Fragmente davon. Vorstehende Ausführungen hinsichtlich einer Verände-

rung der Wildtyp-Sequenz eines Rezeptors bzw. eines Liganden gelten entsprechend für deren Untereinheiten und funktionellen Teile davon, die zu einer gegenseitigen Bindung beitragen.

Der Ausdruck "Linker" betrifft Linker jeglicher Art, die sich zur Verbindung von Polypeptiden eignen. Beispiele solcher Linker sind bifunktionelle, chemische Cross-Linker, z.B. DPD PB. Ferner kann der Linker eine durch die beiden Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke sein. Des Weiteren kann der Linker ein Polypeptid sein.

In bevorzugter Ausführungsform ist ein vorstehendes Konjugat ein Fusionspolypeptid. In diesem können die zwei, eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide miteinander fusioniert sein und der Linker einer durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke darstellen. Vorzugsweise ist der Linker ein Polypeptid, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet. Beispiele letzteren Fusionspolypeptids sind in den Figuren 1 und 2 angegeben. Diese Fusionspolypeptide umfassen ein humanes sIL-6R-Polypeptid, d.h. die extrazelluläre Untereinheit eines Interleukin-6-Rezeptors, und ein humanes IL-6-Polypeptid, wobei die Polypeptide über unterschiedliche Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Diese Fusionspolypeptide werden mit H-IL-6 bezeichnet. Eine Variation von H-IL-6, die von dem sIL-6R-Polypeptid nur die Aminosäuren Pro 114 bis Ala 323 enthält, wird ebenfalls bereitgestellt. Ferner wird eine Variation von H-IL-6 bereitgestellt, welche die Aminosäuren 113 bis 323 des sIL-6R-Polypeptids und die Aminosäuren 29 bis 212 des IL-6-Polypeptids umfasst. Des Weiteren wird ein Fusionspolypeptid H-IL-6 bereitgestellt, dessen IL-6-Polypeptid die Sequenz von Fig. 3 umfasst. Das sIL-6R-Polypeptid dieses Fusionspolypeptids umfasst eine vollständige Sequenz bzw. die Sequenz zwischen den Aminosäuren 113 (114) bis 323 eines sIL-6R-Polypeptids. Darüberhinaus wird ein Fusionspolypeptid bereitgestellt, das die extrazelluläre Untereinheit eines humanen CNTF-Rezeptors und humanes CNTF umfasst, wobei beide Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein vorstehendes Fusionspolypeptid kodierende DNA. Vorzugsweise kodiert die DNA für ein Fusionspolypeptid, bei dem die zwei, eine Affinität zueinander aufweisenden Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Ein Beispiel letzterer DNA ist in Fig. 1 angegeben. Diese DNA wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als CDM8-H-IL-6 unter DSM 10549 am 27. 2. 1996 hinterlegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100, Ycpad1 und Vektoren für *Pichia pastoris* zu nennen, wobei letztere bevorzugt sind, während für die Expression in tierischen Zellen, die in einem Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen können, z.B. pKCR, pEFBOS, pCEV4 und pCDM8 anzugeben sind, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A. Der Fachmann wird berücksichtigen, daß für die Expression einer erfindungsgemäßen, sIL-6R-Sequenzen enthaltenden, DNA Vektoren angeraten sind, die eine Expression in eukaryotischen Zellen ermöglichen.

Ferner kennt der Fachmann geeignete Zellen, um eine erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, wobei letzterer bevorzugt ist, die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, Vero, HeLa und COS, wobei letztere bevorzugt sind, sowie die Insektenzellen sf9.

Des Weiteren weiß der Fachmann, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Auch kennt er Bedingungen, Zellen zu transformieren bzw. transfizieren und diese dann zu kultivieren. Darüberhinaus sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA

exprimierte Fusionspolypeptid zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Fusionspolypeptid gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden Fusionspolypeptid zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen Fusionspolypeptid erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen. Dies kann durch die Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate wie auch durch den Einsatz erfindungsgemäßer DNA in einer Gentherapie erfolgen. Insbesondere können die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor behoben werden. Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß sie kostengünstig eingesetzt werden kann. Dies zeigt sich insbesondere in der Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate zur Beeinflussung der gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor.

Ferner eignet sich die vorliegende Erfindung zur ex vivo Expansion von Stammzellen, insbesondere humanen Stammzellen. Besonders bemerkenswert ist es dabei, daß mit einem erfindungsgemäßen Konjugat H-IL-6 mehr Stammzell-Kolonien im Soft-Agar erhalten werden, als dies mit den einzelnen Komponenten IL-6 und sIL-6R möglich ist. Die vorliegende Erfindung stellt somit auch einen wichtigen Beitrag dar, gezielt in die Bildung von Blutzellen einzutreten.

Des Weiteren stellt die vorliegende Erfindung mit einem Fusionspolypeptid H-IL-6, das als IL-6-Polypeptid die Sequenz von Fig. 3 umfaßt, ein Mittel bereit, das sich

- 6 -

als IL-6-Rezeptor-Antagonist eignet. Ein solches Mittel ist von hohem therapeutischen Wert.

Die Durchführung der vorliegenden Erfindung kann durch die erfindungsgemäßen Antikörper überwacht werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Fig. 1 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGGSGGGSGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH₂-Terminus von humanem IL-6.

Fig. 2 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGGSGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH₂-Terminus von humanem IL-6.

Fig. 3 zeigt die Aminosäuresequenz des in einem erfindungsgemäßen Fusionspolypeptid H-IL-6 vorliegenden IL-6-Polypeptids.

Fig. 4 zeigt die Expansions- und Koloniebildungsfähigkeit eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA

Es wurde die DNA von Fig. 1 hergestellt. Dazu wurde humane IL-6R cDNA (Schooltink et al., Biochem. J. (1991) 277, 659-664) verwendet. Diese cDNA wurde in das Expressionsplasmid pCDM8 über die Restriktionsstelle Xho I einkloniert (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480). Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter Verwendung der Primer (1) (pCDM8 5' Primer: 5' TAATACGACTCACTATAGGG3') und Primer (2) (sIL-6R 3' Primer: 5'CCGCTCGAGCTGGAGGGACTCCTGGGA 3') bei Standardbedingungen 5 ein sIL-6R Fragment generiert, das nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I in das geöffnete Plasmid pCDM8 einkloniert wurde. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R. Anschließend wurde eine zweite PCR Reaktion mit IL-6 cDNA, die ebenfalls in das Expressionsplasmid pCDM8 unter 10 Verwendung von Xho I einkloniert worden war, durchgeführt. Es wurden die Primer (3) (IL-6-5' Primer: 5' CGGCTCGAGCCAGTACCCCCAGGGAGAA3') und Primer (4) (pCDM8 3' Primer: 5'CCACAGAAGTAAGGTTCCCTT3') verwendet. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Xho I und Not I geschnitten 15 und in das Plasmid pCDM8-sIL-6R einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6. Anschließend wurde ein synthetischer Linker hergestellt, der aus zwei Oligonukleotiden bestand: Primer (5) (5'TCGAG-GAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTG3') und 20 Primer (6) (5'TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCCA-GAACCTCCACCTCC3'). Die Oligonukleotide (5) und (6) wurden nach Standardmethoden zu einem Doppelstrang zusammengefügt und anschließend in das mit 25 dem Restriktionsenzym Xho I verdaute Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6 einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-H-IL-6.

Beispiel 2: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA

30 Es wurde die DNA von Fig. 2 hergestellt. Hierzu wurde vorgegangen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Als Primer (5) und (6) wurden jedoch verwendet: Primer (5) (5'TCGAGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTG3') und Primer (6)

- 8 -

(5' TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCC3'. Es wurde das Plasmid pCDM8-H-IL-6-(2) erhalten.

Beispiel 3: Expression eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids

5

COS-7-Zellen wurden mit pCDM8-H-IL-6 von Beispiel 1 bzw. pCDM8-H-IL-6(2) von Beispiel 2 mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Es wurden 10^7 COS-7 Zellen mit $20\mu\text{g}$ Plasmid mit Hilfe eines Gene-Pulsers (Bio-Rad) bei $960\mu\text{F}$ und 230 V elektroporiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen metabolisch mit [^{35}S]-Cystein/Methionin 4 h radioaktiv markiert und 2 h mit nicht radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Der Überstand aus Zellysat und Zellüberstand wurde nach Standardmethoden (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480) mit einem anti-IL-6 Antikörper immunpräzipitiert und nach SDS-Gel-elektrophorese durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Transfizierte COS-7 Zellen sezernierten ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt und nicht von untransfizierten Zellen gebildet wurde.

10

15

20

25

30

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem anti-IL-6 Antikörper detektiert. Wiederum exprimierten transfizierte COS-7 Zellen ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt wurde.

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden mit Hilfe eines kommerziellen ELISA auf IL-6 (CLB, Amsterdam) und sIL-6R (Seromed, Gießen) untersucht. Mit beiden ELISAs wurde H-IL-6 detektiert. Die Konzentration von H-IL-6 im Zellüberstand betrug etwa $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$.

Beispiel 4: Stimulation der Haptoglobin-Expression durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid

30

Es wurden die humanen Hepatomazelllinien HepG2, HepG2-IL-6 und HepG2-PDI verwendet.

- 9 -

HepG2 Zellen (ATCC HB 8065) werden durch IL-6, nicht aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

HepG2-IL-6 Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Diese Zellen regulieren aufgrund der IL-6 Expression endogenes IL-6R herunter und exprimieren somit kein IL-6R. HepG2-IL-6 Zellen werden nicht durch IL-6, aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

HepG2-PDI Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Hierzu wies das Expressionsplasmid eine IL-6 cDNA auf, durch die das exprimierte IL-6 Protein ein COOH-terminales Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER) enthielt. Daraus resultierte, daß diese Zellen nicht durch das exprimierte IL-6, sondern auch IL-6R im ER zurückhielten. Im Gegensatz zu HepG2-IL-6 Zellen sezernieren aber HepG2-PDI Zellen kein IL-6 und können nur durch die Kombination von IL-6 und sIL-6R stimuliert werden, Haptoglobin zu exprimieren.

Die vorstehenden Hepatomazelllinien wurden nach Standardbedingungen in 96er Zellkulturplatten kultiviert (Rose-John et al., J. Biol. Chem. 268 (1993); 22084-22091). Die Zellen wurden mit IL-6, sIL-6R, IL-6 + sIL-6R bzw. Zellüberständen aus mit pCDM8-H-IL-6, pCDM8-H-IL-6(2) bzw. pCDM8 transfizierten COS-7 Zellen von Beispiel 3 18 h stimuliert. Der Zellüberstand wurde geerntet und die Haptoglobinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt (vgl. Tabelle I).

25

30

- 10 -

Tabelle I

Stimulation der Haptoglobin-Expression

	IL-6	sIL-6R	IL-6 + sIL-6R	H-IL-6	Kontrolle
HepG2	+	-	++	+++	-
HepG2-IL-6	-	++	++	+++	-
HepG2-PDI	-	-	++	+++	-

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid, H-IL-6, in der Lage ist, die Expression von Haptoglobin in Zellen zu stimulieren, d.h. die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen.

Beispiel 5: Expansion und Koloniebildung von humanen CD34⁺-Zellen durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid

Aus humanem Knochenmark bzw. aus Blut von Patienten, deren Stammzellen durch Injektion von G-CSF mobilisiert worden waren, wurden Zellen isoliert, die den Oberflächenmarker CD34 exprimieren. 6000 dieser Zellen wurden in 3ml Medium in Zellkulturgefäße platziert. Nach zwei Wochen zeigte es sich, daß eine Inkubation der Zellen mit den Zytokinen SCF, IL-3 und H-IL-6 (erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid), wie auch mit SCF, IL-3 und IL-6 eine starke Proliferation verursachte. Von den entstandenen Zellen wurden 1000 Zellen in neue Zellkulturgefäße platziert. Nach zwei Wochen in einem standartisierten Kolonie-Induktions-Versuch waren die mit SCF, IL-3 und H-IL-6 behandelten Zellen in der Lage, etwa dreimal mehr Kolonien zu bilden als mit SCF, IL-3 und IL-6 behandelte Zellen.

Dieses Ergebnis zeigt, daß Zellen, die durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid H-IL-6 stimuliert wurden, ein höheres koloniebildendes Potential besitzen als durch IL-6 stimulierte Zellen (vgl. Fig. 4).

Patentansprüche

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.
- 5 2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das eine Polypeptid ein Rezeptor und das andere ein den Rezeptor bindender Ligand ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
- 10 4. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor und der Ligand ein Zytokin ist.
- 15 6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
- 20 7. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke ist.
- 25 9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein bifunktioneller, chemischer Cross-Linker ist.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.

- 12 -

11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein Polypeptid ist, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet.
12. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 10 oder 11.
5
13. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 12.
14. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 13.
- 10 15. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 - 11 und der DNA nach Anspruch 12 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

Fig. 1

1	GTGGACCCATGGAGTGGTAGCCGAGGAAAGC	ATG	CTG	GCC	GTC	GCG	CTG	CTG	GCT	63											
1	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>A</u>											
64	GCC	CTG	CTG	GGC	GGG	GGG	CTG	GGC	CCG	CTG	CTG	CTG	GCT	123							
11	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>C</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	10			
124	GCA	AGA	GGC	GTG	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA	GGG	AGC	GTG	ACT	CTG	ACC	CTG	CCG	GGG	GTA	183	
31	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	50
184	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT	GCC	ACT	GTT	CAC	TGG	CTG	CTC	AGG	AAG	CCG	GCT	GCA	GGC	TCC	CAC	243
51	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>W</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	70
244	CCC	AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	CTG	CTG	CTG	AGG	TCG	TGG	CAG	CTG	CTC	CAC	GAC	303
71	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>W</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>D</u>	90	
304	TCT	GGA	AAC	TAT	TCA	TGC	TAC	CGG	GCC	GGC	CGC	CCA	GCT	GGG	ACT	GTC	CAC	TGG	CTG	CTG	363
91	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>Y</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	110
364	GAT	GTT	CCC	CCC	GAG	GAG	CCC	CAG	CTC	TCC	TGC	TTC	CGG	AAG	AGC	CCC	CTC	AGC	AAT	GTT	423
111	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>F</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	130
424	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT	CCT	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA	AAG	GCT	TGG	CTG	TG	GTT	483
131	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	150
484	AGG	AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC	TTC	CAG	GAG	CCG	TCC	CAG	TAT	TCC	CAG	GAG	543
151	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	170
544	TCC	CAG	AAG	TTC	TCC	TGC	CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GGA	GAC	AGC	TCT	TTC	TAC	ATA	GTG	603
171	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	190
604	TCC	ATG	TGC	GTC	GCC	AGT	AGT	GTC	GGG	AGC	AAG	TTC	AGC	AAA	ACT	CAA	ACC	TTT	CAG	GCT	663
191	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	210
664	TGT	GGA	ATC	TGG	CAG	CCT	GAT	CCG	CCT	GCC	AAAC	ATC	ACA	GTC	ACT	GCC	GTC	AGA	AAC	723	
211	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	230
724	CCC	CCG	TGG	CTC	AGT	GTC	ACC	TGG	CAA	GAC	CCC	CAC	TCC	TGG	AAC	TCA	TCT	TTC	TAC	AGA	783
231	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>W</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>W</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>R</u>	250	
784	CTA	CGG	TTT	GAG	CTC	AGA	TAT	CGG	GCT	GAA	CGG	TCA	AAG	ACA	TTC	ACA	ACA	TGG	ATG	GTC	843
251	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>Y</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>W</u>	<u>M</u>	<u>V</u>	270	

Fortsetzung Fig. 1

844	AAG	GAC	CTC	CAG	CAT	CAC	TGT	GTC	ATC	CAC	GAC	TGG	AGC	GGC	CTG	AGG	CAC	GTG	GTG	903	
271	K	D	L	Q	H	C	V	I	H	D	A	W	S	G	L	R	H	V	V	290	
904	CAG	CTT	CGT	GCC	CAG	CAG	GAG	TTC	GGG	CAA	GGC	GAG	TGG	AGC	CCG	GAG	GCC	963			
291	Q	L	R	A	Q	E	F	G	Q	G	E	W	S	E	W	S	P	E	A	310	
964	ATG	GGC	ACG	CCT	TGG	ACA	GAA	TCC	AGG	AGT	CCT	CCA	GCT	CGA	GGG	GGT	TCT	GGA	1023		
311	M	G	T	P	W	T	E	S	R	S	P	P	A	R	G	G	G	S	G	330	
1024	GGT	GGA	GGT	TCT	GGA	GGT	GGA	GCT	TCT	GTC	GAG	CCA	GTA	CCC	CCA	GGA	GAA	GAT	TCC	AAA	1083
331	G	G	G	S	G	G	G	S	V	E	P	V	P	P	G	E	D	S	K	350	
1084	GAT	GTA	GCC	GCC	CCA	CAC	CAG	CCA	CTC	ACC	TCT	TCA	GAA	CGA	ATT	GAC	AAA	CAA	ATT	1143	
351	D	V	A	P	H	R	Q	P	L	T	S	S	E	R	I	D	K	Q	I	370	
1144	CGG	TAC	ATC	CTC	GAC	GGC	ATC	TCA	GCC	CTG	AGA	AAG	GAG	ACA	TGT	AAC	AAC	ATG	1203		
371	R	Y	I	L	D	G	I	S	A	L	R	K	E	T	C	N	K	S	N	390	
1204	TGT	GAA	AGC	AGC	AAA	GAG	GCA	CTG	GCA	AAA	AAC	ATC	CTG	AAC	CTT	CCA	AAG	ATG	GAA	1263	
391	C	E	S	S	K	E	A	L	A	E	N	N	L	N	L	P	K	M	A	410	
1264	AAA	GAT	GGA	TGC	TTC	CAA	TCT	GGA	TTT	ATC	GAG	GAG	ACT	TGC	CTG	GTG	AAA	ATC	ATC	ACT	1323
411	K	D	G	C	F	Q	S	G	F	N	E	E	T	C	L	V	K	I	T	430	
1324	GTC	CTT	TTG	GAG	TTT	GAG	GTA	TAC	CTA	GAG	TAC	CTC	CAG	AAC	AGA	TTT	GAG	AGT	GAG	1383	
431	G	L	E	F	E	V	Y	L	E	Y	L	Q	N	R	F	E	S	S	E	450	
1384	GAA	CAA	GCC	AGA	GCT	GTG	CAG	ATG	AGT	ACA	AAA	GTC	CTG	ATC	CAG	TTC	CTG	CAG	AAA	AAG	1443
451	E	Q	A	R	V	Q	M	S	T	K	V	L	I	Q	F	L	Q	K	K	470	
1444	GCA	AAG	AAT	CTA	GAT	GCA	ATA	ACC	ACC	ACA	AAT	GCC	AGC	CCT	CTG	CTG	ACG	ACG	1503		
471	A	K	N	L	D	A	I	T	T	P	D	P	T	T	N	A	S	L	L	490	
1504	AAG	CTG	CAG	GCA	CAG	AAAC	CAG	TGG	CTG	CAG	GAC	ATG	ACA	ACT	CAT	CTG	CGC	AGC	1563		
491	K	L	Q	A	Q	N	Q	W	L	Q	D	M	T	T	H	L	I	R	S	510	
1564	TTT	AAG	GAG	TTC	CTG	CAG	TCC	AGC	CTG	AGG	GCT	CTT	CGG	CAA	ATG	TAG	CATGGCACCGTGGAC	1627			
511	F	K	E	F	L	Q	S	S	L	R	A	L	R	Q	M	.			525		

Fig. 2

1	GTGGACCC	ATG	GAG	TGG	TAG	CCGAGGAA	GCC	ATG	CTG	GCC	GTC	GCG	TGC	GCG	TGC	CTG	GCT	63			
11	A	L	A	P	A	A	L	A	P	R	C	P	A	Q	E	V	L	A	10		
64	GCC	CTG	CTG	GCC	GGG	CCG	GGG	CTG	CTG	CCA	GGG	CCG	TGC	CCT	GCG	CAG	GAG	GTC	123		
31	A	R	G	V	L	T	S	L	P	G	D	S	V	T	L	T	C	P	G	50	
124	GCA	AGA	GGC	GTC	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA	GGG	GAC	AGC	GTC	ACT	CTG	ACC	TGC	CCG	GGA	183	
51	E	P	E	D	N	A	T	V	H	W	V	L	R	K	P	A	A	G	S	70	
184	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT	GCC	ACT	GTG	CAC	TGG	GTC	CTG	AGG	AAG	CCG	GCT	GCA	GGC	TCC	243	
71	P	S	R	W	A	G	M	R	R	L	L	R	S	V	Q	L	H	D	90		
244	CCC	AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	CTG	CTG	AGG	TGG	CAG	CTC	CAC	GAC	303			
91	S	G	N	Y	S	C	Y	R	A	G	R	P	A	G	T	V	H	L	V	110	
304	TCT	CGA	AAC	TAT	TCA	TGC	TAC	CGG	GGC	CGC	CCA	GCT	GGG	ACT	GTC	CAC	TTG	CTG	GTC	363	
111	D	V	P	P	E	E	P	Q	L	S	C	F	R	K	S	P	L	S	N	130	
364	GAT	GTT	CCC	GGG	GAG	CCC	CAG	CTG	TCC	TCC	TGC	CTG	AAG	AGC	CCC	CTC	AAC	AAT	GTT	423	
131	V	C	E	W	G	P	R	S	T	P	S	L	T	T	K	A	V	L	L	V	150
424	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT	CCT	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA	AAG	GCT	GTG	CTC	TTG	GTC	483
151	R	K	F	Q	N	S	P	A	E	D	F	Q	E	P	C	Q	Y	S	Q	E	170
484	AGG	AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC	TTC	CAG	GAG	CCG	TGC	CAG	TAT	TCC	CAG	GAG	543
171	S	Q	K	F	S	C	Q	L	A	V	P	E	G	D	S	S	F	Y	I	V	190
544	TCC	CAG	AAG	TTC	TCC	TGC	CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GCA	GAC	AGC	TCT	TTC	TAC	ATA	GTG	603
191	S	M	C	V	A	S	S	V	G	S	K	F	S	K	T	Q	T	F	Q	G	210
604	TCC	ATG	TGC	GTC	GCC	AGT	AGT	GTC	GGG	AGC	AAG	TTC	AGC	AAA	ACT	CAA	ACC	TTT	CAG	GGT	663
211	C	G	I	L	Q	P	D	P	P	A	N	I	T	V	T	A	V	A	R	N	230
664	TGT	GGG	ATC	TTG	CAG	CCT	GAT	CCG	CCT	GCC	AAC	ATC	ACA	GTC	ACT	GCC	GTG	GCC	AGA	AAC	723
231	P	R	W	L	S	V	T	W	Q	D	P	H	S	W	N	S	S	F	Y	R	250
724	CCC	CGC	TGG	CTC	AGT	GTC	ACC	TGG	CAG	CCC	CAC	TCC	TGG	AAC	TCA	TCT	TTC	TAC	AGA	783	
251	L	R	F	E	L	R	Y	R	A	E	R	S	K	T	F	T	W	M	V	843	

Fortsetzung Fig. 2

904	CAG	CTT	CGT	GCC	CAG	GAG	TTC	GGG	CAA	GGG	GAG	TGG	AGC	CCG	GAC	963					
291	Q	L	R	A	Q	E	F	G	Q	G	E	W	S	P	E	A	310				
964	ATG	GGC	ACG	CCT	TGG	ACA	GAA	TCC	AGG	AGT	CCT	CCA	GCT	CGA	GGG	GGT	TCT	GGA	1023		
311	M	G	T	P	W	T	E	S	R	S	P	P	A	R	G	G	G	S	G	330	
1024	GGT	GGA	GGT	TCT	GTC	GAG	CCA	GTA	CCC	CCA	GGG	GAA	GAT	TCC	AAA	GAT	GTA	GCC	CCA	1083	
331	G	G	G	S	V	E	P	V	P	G	E	D	S	K	D	V	A	A	P	350	
1084	CAC	AGA	CAG	CCA	CTC	ACC	TCT	TCA	GAA	CGA	ATT	GAC	AAA	CAA	ATT	CGG	TAC	ATC	CTC	GAC	1143
351	H	R	Q	P	L	T	S	S	E	R	I	D	K	Q	I	R	Y	I	L	D	370
1144	GGC	ATC	TCA	GCC	CTG	AGA	AAG	GAG	ACA	TGT	AAC	AAG	AGT	AAC	ATG	TGT	GAA	AGC	AGC	AAA	1203
371	G	I	S	A	L	R	K	E	T	C	N	K	S	N	M	C	E	S	S	K	390
1204	GAG	GCA	CTG	GCA	GAA	AAC	AAC	CTG	AAC	CTT	CCA	AAG	ATG	GCT	GAA	AAA	GAT	GGA	TGC	TTC	1263
391	E	A	L	A	E	N	N	L	N	L	P	K	M	A	E	K	D	G	C	F	410
1264	CAA	TCT	GGG	TTC	AAT	GAG	GAG	ACT	TGC	CTG	GTG	AAA	ATC	ATC	ACT	GGT	CTT	TTG	GAG	TTT	1323
411	Q	S	G	F	N	E	E	T	C	L	V	K	I	I	T	G	L	L	E	F	430
1324	GAG	GTA	TAC	CTA	GAG	TAC	CTC	CAG	AAC	AGA	TTT	GAG	AGT	AGT	GAG	GAA	CMA	GCC	AGA	GCT	1383
431	E	V	Y	L	E	Y	L	Q	N	R	F	E	S	E	E	Q	A	R	A	450	
1384	GTG	CAG	ATG	AGT	ACA	AAA	GTC	CTG	ATC	CAG	TTC	CTG	CAG	AAA	AAG	GCA	AAG	AAT	CTA	GAT	1443
451	V	Q	M	S	T	K	V	L	I	Q	F	L	Q	K	K	A	K	N	L	D	470
1444	GCA	ATA	ACC	ACC	CCT	GAC	CCA	ACC	ACA	AAT	GCC	AGC	CTG	CTG	ACG	AAG	CTG	CAG	GCA	CAG	1503
471	A	I	T	T	P	D	P	T	N	A	S	L	L	T	K	L	Q	A	Q	490	
1504	AAC	CAG	TGG	CTG	CAG	GAC	ATG	ACA	ACT	CAT	CTC	ATT	CTG	CGC	AGC	TTT	AAG	GAG	TTC	CTG	1563
491	N	Q	W	L	Q	D	M	T	T	H	L	I	R	S	F	K	E	F	L	510	
1564	CAG	TCC	AGC	CTG	AGG	GCT	CTT	CGG	CAA	ATG	TAG	C	ATG	GGC	ACC	GTC	GAC			1612	
511	Q	S	S	L	R	A	L	R	Q	M	*									520	

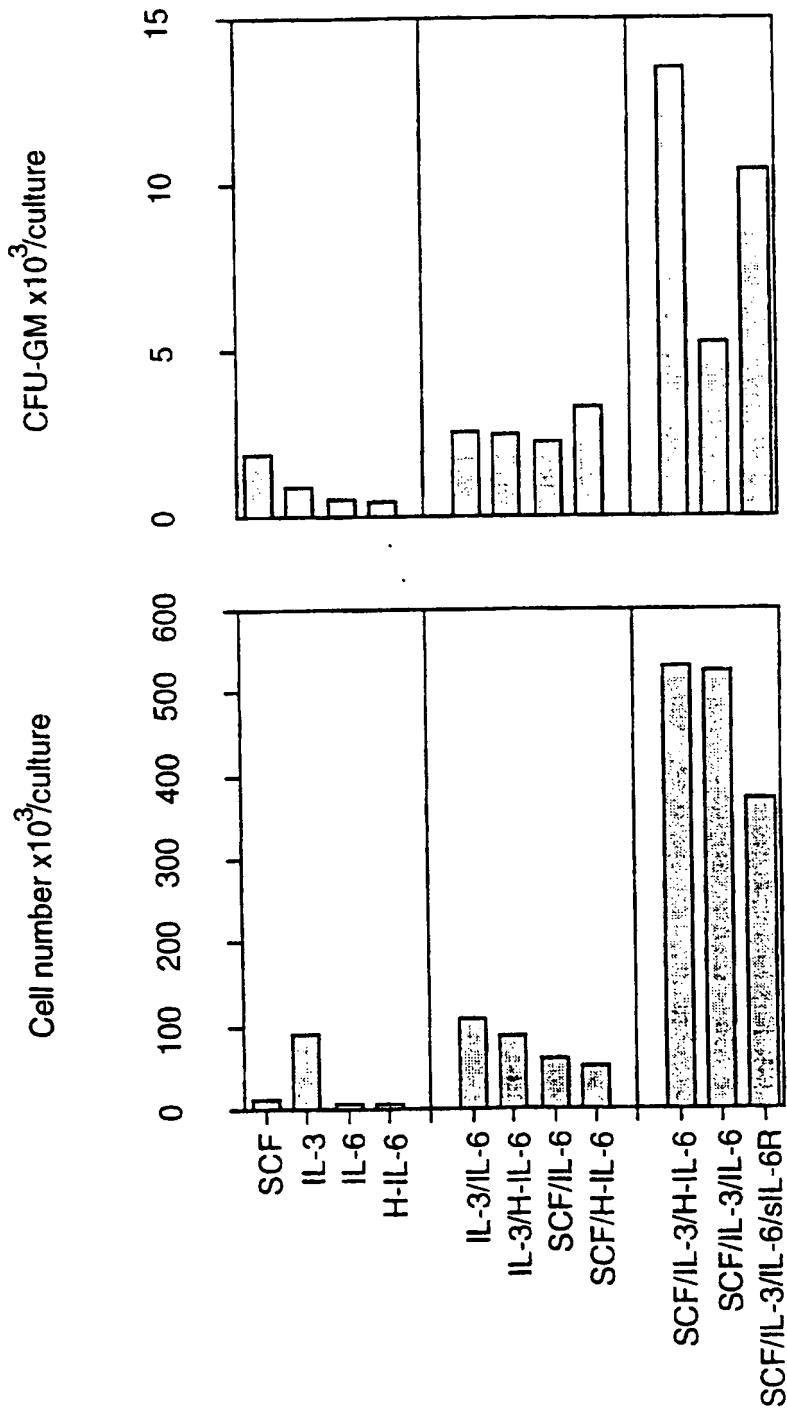
082-
S2
S2
S2
S2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Fig. 3

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
1
Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
5 10 15 20
Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
25 30 35
Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
40 45 50
Ser Pro Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
55 60 65
Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
70 75 80
Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
85 90 95 100
Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
105 110 115
Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
120 125 130
Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
135 140 145
Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Glu Asp Met Pro Thr His
150 155 160
Leu Ile Leu Arg Ser Leu Lys Glu Phe Leu Gln Arg Ser Leu Arg Ala
165 170 175 180
Leu Arg Gln Met
184

Fig. 4





INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/24, 15/12 C07K 14/54, 14/715, 14/71, A61K 47/48, 38/17		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32891 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. September 1997 (12.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00458 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. März 1997 (07.03.97)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 196 08 813.5 7. März 1996 (07.03.96) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Rischerstrasse 12, D-69123 Heidelberg (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 5. Februar 1998 (05.02.98)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): ROSE-JOHN, Stefan [DE/DE]; I. Medizinische Klinik - Abt. Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verfügbungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Obere Zahlbacherstrasse 63, D-55101 Mainz (DE).		(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger-Strasse 246, D-81825 München (DE).	

(54) **Title:** CONJUGATE FOR MODIFYING INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS

(54) **Bezeichnung:** KONJUGAT ZUR BEEINFLUSSUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PROTEINEN

(57) **Abstract**

The present invention concerns a conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity and connected via a linker. It also concerns the use of such a conjugate to modify interactions between proteins.

(57) **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Federation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/DE 97/00458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 6	C12N15/62	C07K19/00	C12N15/24	C12N15/12	C07K14/54
	C07K14/715	C07K14/71	A61K47/48	A61K38/17	

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STOYAN T. ET AL.: "Recombinant soluble human interleukin-6 receptor" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 216, no. 1, 11 August 1993, pages 239-245, XP002047601 see page 241, column 1, paragraph 4 ---	1-6,9
Y		10-15
X	EHLERS M ET AL: "IDENTIFICATION OF TWO NOVEL REGIONS OF HUMAN IL-6 RESPONSIBLE FOR RECEPTOR BINDING AND SIGNAL TRANSDUCTION" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 153, no. 4, 15 August 1994, pages 1744-1753, XP000565715 see page 1, column 2, paragraph 2 ---	1-6,9,15
Y		10-14
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

20 November 1997

Date of mailing of the international search report

15-12-1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten	nal Application No
PCT/DE	97/00458

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 04314 A (DADE INT INC ;WONG HING C (US); RHODE PETER R (US); WEIDANZ JON A) 15 February 1996	1-4,8-15
Y	see the whole document	1-7, 10-15
X	---	1
X	US 5 260 203 A (LADNER ROBERT C ET AL) 9 November 1993	1
Y	see the whole document	1-7, 10-15
X	---	1
X	WO 95 15341 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;CHESTER KERRY ANNE (GB); HAWKINS ROBERT) 8 June 1995	1
Y	see figures 1,11	1-7, 10-15
Y	---	1-6, 10-15
	SUI, X. ET AL.: "gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 92, March 1995, WASHINGTON US, pages 2859-2863, XP002047602 see the whole document	
P,X	---	1
	FISCHER, M. ET AL.: "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion" NATURE BIOTECHNOLOGY., vol. 15, no. 2, February 1997, UBLISHING US, pages 142-145, XP002047603 see the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/DE97/00458**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplementary sheet additional information PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE97/00458

Note:

Inasmuch the claim 15 refers to a treatment method to be applied to human / animal bodies, the research was made based on the quoted effects of the bond/compound

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No

PCT/DE 97/00458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9604314 A	15-02-96	AU 3403995 A		04-03-96
		CA 2196085 A		15-02-96
		EP 0776339 A		04-06-97

US 5260203 A	09-11-93	US 4946778 A		07-08-90
		US 5455030 A		03-10-95
		US 5518889 A		21-05-96
		US 5534621 A		09-07-96
		JP 2000197 A		05-01-90
		DE 3785186 A		06-05-93
		DK 368588 A		01-07-88
		EP 0281604 A		14-09-88
		WO 8801649 A		10-03-88

WO 9515341 A	08-06-95	AU 1194795 A		19-06-95
		CA 2177584 A		08-06-95
		EP 0733072 A		25-09-96
		JP 9505737 T		10-06-97
		NZ 277057 A		27-07-97

INTERNATIONAHLER RECHERCHENBERICHT

Intern: eines Aktenzeichen

PCT/DE 97/00458

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 6	C12N15/62	C07K19/00	C12N15/24	C12N15/12	C07K14/54
	C07K14/715	C07K14/71	A61K47/48	A61K38/17	

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STOYAN T. ET AL.: "Recombinant soluble human interleukin-6 receptor" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 216, Nr. 1, 11.August 1993, Seiten 239-245, XP002047601 siehe Seite 241, Spalte 1, Absatz 4 ---	1-6,9
Y		10-15
X	EHLERS M ET AL: "IDENTIFICATION OF TWO NOVEL REGIONS OF HUMAN IL-6 RESPONSIBLE FOR RECEPTOR BINDING AND SIGNAL TRANSDUCTION" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 153, Nr. 4, 15.August 1994, Seiten 1744-1753, XP000565715 siehe Seite 1, Spalte 2, Absatz 2 ---	1-6,9,15
Y		10-14
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20.November 1997	15-12-1997
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Chambonnet, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 97/00458

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 04314 A (DADE INT INC ;WONG HING C (US); RHODE PETER R (US); WEIDANZ JON A) 15. Februar 1996	1-4,8-15
Y	siehe das ganze Dokument	1-7, 10-15
X	---	
X	US 5 260 203 A (LADNER ROBERT C ET AL) 9.November 1993	1
Y	siehe das ganze Dokument	1-7, 10-15
X	---	
X	WO 95 15341 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;CHESTER KERRY ANNE (GB); HAWKINS ROBERT) 8.Juni 1995	1
Y	siehe Abbildungen 1,11	1-7, 10-15
Y	---	
	SUI, X. ET AL.: "gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Bd. 92, März 1995, WASHINGTON US, Seiten 2859-2863, XP002047602	1-6, 10-15
	siehe das ganze Dokument	
P,X	---	
P,X	FISCHER, M. ET AL.: "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion" NATURE BIOTECHNOLOGY., Bd. 15, Nr. 2, Februar 1997, UBLISHING US, Seiten 142-145, XP002047603	1
P,X	siehe das ganze Dokument	

2		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00458

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung :

So weit der Anspruch 15
sich auf ein Verfahren zur
Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die
Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen
der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 97/00458

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9604314 A	15-02-96	AU	3403995 A	04-03-96
		CA	2196085 A	15-02-96
		EP	0776339 A	04-06-97

US 5260203 A	09-11-93	US	4946778 A	07-08-90
		US	5455030 A	03-10-95
		US	5518889 A	21-05-96
		US	5534621 A	09-07-96
		JP	2000197 A	05-01-90
		DE	3785186 A	06-05-93
		DK	368588 A	01-07-88
		EP	0281604 A	14-09-88
		WO	8801649 A	10-03-88

WO 9515341 A	08-06-95	AU	1194795 A	19-06-95
		CA	2177584 A	08-06-95
		EP	0733072 A	25-09-96
		JP	9505737 T	10-06-97
		NZ	277057 A	27-07-97

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/24, 15/12 C07K 14/54, 14/715, 14/71, A61K 47/48, 38/17		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32891 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. September 1997 (12.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00458 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. März 1997 (07.03.97)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 196 08 813.5 7. März 1996 (07.03.96)		DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen und Erklärung.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Rischerstrasse 12, D-69123 Heidelberg (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 5. Februar 1998 (05.02.98)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): ROSE-JOHN, Stefan [DE/DE]; I. Medizinische Klinik - Abt. Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Obere Zahlbacherstrasse 63, D-55101 Mainz (DE).		Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche und Erklärung: 19. März 1998 (19.03.98)	
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger-Strasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) **Title:** CONJUGATE FOR MODIFYING INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS

(54) **Bezeichnung:** KONJUGAT ZUR BEEINFLUSSUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PROTEINEN

(57) **Abstract**

The present invention concerns a conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity and connected via a linker. It also concerns the use of such a conjugate to modify interactions between proteins.

(57) **Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfasst, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 12. Januar 1998 (12.01.98) eingegangen;
ursprüngliche Ansprüche 1-15 durch geänderte Ansprüche 1-12 ersetzt (2 Seiten)]

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke oder ein Polypeptid ist.
- 5 2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das eine Polypeptid ein Rezeptor und das andere ein den Rezeptor bindender Ligand ist.
- 10 3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
4. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
- 15 5. Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor und der Ligand ein Zytokin ist.
6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
- 20 7. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.

- 14 -

9. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 8.
10. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 9.
- 5 11. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 10.
12. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 - 8 und der DNA nach Anspruch 9 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

10

IN ARTIKEL 19 GENANNTE ERKLÄRUNG

I) Als Stand der Technik werden die folgenden Druckschriften genannt:

- (D1) Stoyan et al., European Journal of Biochemistry, Bd. 216, Nr. 1, S. 239-245 (1993)
- (D2) Ehlers et al., Journal of Immunology, Bd. 153, Nr. 4, S. 1744-1753 (1994)
- (D3) WO-A-96/04314
- (D4) US-A-5 260 203
- (D5) WO-95/15341
- (D6) Sui et al., Proceed. of the National Academy of Sciences USA, Bd. 92, S. 2859-2863 (1995)
- (D7) Fischer et al., Nature Biotechnology, Bd. 15, Nr. 2, S. 142-145 (Febr. 1997)

II) Der geänderte Anspruch 1 betrifft nun ein Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke oder ein Polypeptid ist.

III) Gegenüber dem im Recherchenbericht genannten Stand der Technik ist der Gegenstand der vorliegenden Anmeldung neu und erfinderisch. In keiner der zahlreichen Entgegenhaltungen D1-D6 ist ein Konjugat gezeigt oder nahegelegt, das zwei eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind und das dadurch gekennzeichnet ist, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke oder ein Polypeptid ist. D7 stellt als P,X-Dokument keinen Stand der Technik dar, da von wirksamer Inanspruchnahme der Priorität ausgegangen wird.

This Page Blank (uspto)